

Effet dégradant de la nattokinase sur la protéine de pointe du SARS-CoV-2

Auteurs

[Takashi Tanikawa](#), [Yuka Kiba](#), [James Yu](#), [Kate Hsu](#), [Shinder Chen](#), [Ayako Ishii](#), [Takami Yokogawa](#), [Ryuichiro Suzuki](#), [Yutaka Inoue](#), [Masashi Kitamura](#)

Laboratory of Nutri-Pharmacotherapeutics Management, School of Pharmacy, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Josai University, Saitama 350-0295, Japan

Laboratory of Pharmacognocny, School of Pharmacy, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Josai University, Saitama 350-0295, Japan

Contek Life Science Co., Ltd., Taipei City 100007, Taiwan

CellMark Japan, Tokyo 102-0071, Japan

Laboratory of Natural Products & Phytochemistry, Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Josai University, Saitama 350-0295, Japan

Authors to whom correspondence should be addressed.

These authors contributed equally to this work.

Molecules **2022**, *27*(17), 5405; <https://doi.org/10.3390/molecules27175405>

Received: 14 July 2022 / Revised: 17 August 2022 / Accepted: 23 August 2022 /

Published: 24 August 2022

La maladie à coronavirus 2019 (COVID-19), causée par le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2), est apparue comme une pandémie et a infligé d'énormes dommages à la vie des gens et à l'économie de nombreux pays dans le monde. Cependant, les agents thérapeutiques contre le SRAS-CoV-2 ne sont toujours pas connus. Le SRAS-CoV-2 possède une protéine de pointe (protéine S), et le clivage de la protéine S est essentiel à l'entrée du virus. La nattokinase est produite par *Bacillus subtilis* var. *natto* et est bénéfique pour la santé humaine. Dans cette étude, nous avons examiné l'effet de la nattokinase sur la protéine S du SRAS-CoV-2. Lorsque des lysats cellulaires transfectés avec la protéine S ont été incubés avec de la nattokinase, la protéine S a été dégradée de manière dose et temps dépendante. Une analyse par immunofluorescence a montré que la protéine S à la surface des cellules était dégradée lorsque la nattokinase était ajoutée au milieu de culture. Ainsi, nos résultats suggèrent que la nattokinase présente un potentiel pour l'inhibition de l'infection par le SRAS-CoV-2 via la dégradation de la protéine S.

1. Introduction

La maladie à coronavirus 2019 (COVID-19), causée par le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2), s'est propagée dans le monde entier. La pandémie de COVID-19 a touché plus de 437 millions de personnes et provoqué plus de 6,3 millions de décès (<https://covid19.who.int/>, consulté le 4 juillet 2022). L'entrée du SRAS-CoV-2 dans les cellules hôtes est médiée par la protéine transmembranaire spike (protéine S), qui forme des homotrimères qui s'étendent à partir de l'enveloppe virale. La protéine S est traitée et activée par des protéases cellulaires, notamment la protéine sérine transmembranaire 2 (TMPRSS2), la cathepsine et la furine. Elle comprend deux sous-unités fonctionnelles, S1 et S2 ; la sous-unité S1 du SRAS-CoV-2 initie la liaison virus-récepteur en

interagissant avec le récepteur de la cellule hôte humaine, l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2), et la sous-unité S2 participe à la fusion virale avec la cellule cible, permettant l'entrée du virus [1]. Le domaine de liaison au récepteur (RBD) de la sous-unité S1 est responsable de la liaison à l'ACE2. Le clivage de la protéine S se produit à la frontière entre les sous-unités S1 et S2.

Actuellement, de nombreux pays participent au développement de vaccins pour se protéger contre l'infection par le SRAS-CoV-2, ce qui a permis de réduire le nombre d'infections par le SRAS-CoV-2. Cependant, de nombreuses variantes du SRAS-CoV-2, y compris des souches dont les épitopes cibles du vaccin ont muté, ont été signalées [2,3]. Il se peut que la vaccination ne protège pas complètement contre l'infection par le SRAS-CoV-2, car le nombre de patients atteints de COVID-19 augmente après la vaccination. Il est donc important de développer de nouveaux traitements pour les infections par le SRAS-CoV-2.

Le natto est un aliment traditionnel japonais populaire fabriqué à partir de graines de soja fermentées par *Bacillus subtilis* var. *natto*. La nattokinase est présente dans le natto [4] et est l'une des plus importantes enzymes extracellulaires produites par le *B. subtilis* var. *natto* [5]. La nattokinase est composée de 275 acides aminés et a une taille d'environ 28 kDa [6,7]. La nattokinase inactive l'inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène et augmente la fibrinolyse [8]. Elle diminue également les taux plasmatiques de fibrinogène, de facteur VII, de cytokines et de facteur VIII [9]. La nattokinase possède le plus haut pouvoir de dissolution des caillots parmi les anticoagulants naturellement connus [10]. Un essai clinique a démontré que la consommation orale de nattokinase n'était associée à aucun effet indésirable [11]. Ainsi, la nattokinase est maintenant considérée comme une enzyme efficace, sûre et économique qui a attiré une attention centrale dans les études sur les médicaments thrombolytiques [12,13]. En outre, la nattokinase est utilisée dans le traitement de certaines tumeurs [14,15].

Une étude récente a révélé que l'extrait de natto inhibe l'infection par l'herpèsvirus bovin 1 (BHV-1) et le SARS-CoV-2 [16]. Ces résultats indiquent que la protéase de l'extrait de natto pourrait être efficace contre l'infection par le SRAS-CoV-2. Dans cette étude, nous avons cherché à savoir si l'inhibition de l'infection par le SARS-CoV-2 par l'extrait de natto est causée par la nattokinase dérivée de *B. subtilis* var. *natto*.

2. Résultats et discussion

2.1. Effets dégradants de la nattokinase sur la protéine S du SARS-CoV-2 in vitro

Nous avons d'abord cherché à savoir si la nattokinase contenue dans l'extrait de natto pouvait dégrader la protéine S du SARS-CoV-2. La protéine S du SARS-CoV-2 joue un rôle important dans le récepteur ACE2 de la cellule hôte pendant les premiers stades de l'infection [17]. Après avoir mélangé le lysat cellulaire d'expression de la protéine S avec une série de dilutions quadruples de nattokinase (32 µg/mL, 8 µg/mL, 2 µg/mL, 500 ng/mL, 125 ng/mL, 31,25 ng/mL et 7,8125 ng/mL), on a procédé à un transfert Western. La longueur totale de la protéine S (sous-unités S1 et S2) et la sous-unité S2 sont apparues sous forme de bandes lorsque le lysat cellulaire d'expression de la protéine S a été incubé avec du D-PBS à des concentrations de nattokinase de 500 ng/mL, 125 ng/mL, 31,25 ng/mL et 7,8125 ng/mL (figure 1A). Ensuite, nous avons examiné si la nattokinase dégrade la protéine S de manière dépendante du temps. Le lysat a ensuite été incubé avec 1 µg/mL de nattokinase pendant 10 à 180 min. La protéine S du SARS-CoV-2 a été dégradée par la nattokinase après 60-180 min d'incubation, mais pas après 10 et 30 min d'incubation (Figure 1B). Ainsi, la nattokinase a dégradé la protéine S de manière dose et temps-dépendante.

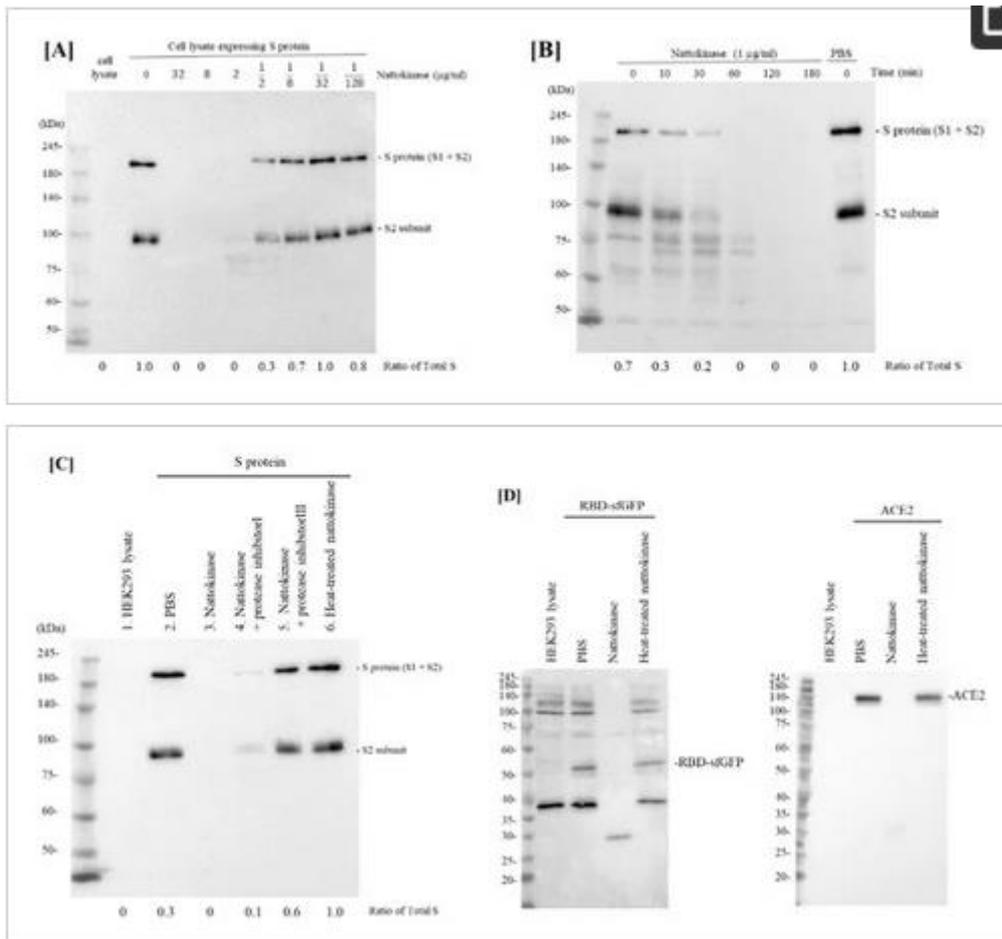


Figure 1 : (A) Effets dégradants de la nattokinase de manière dose-dépendante. De la nattokinase diluée en série (32 µg/mL, 8 µg/mL, 2 µg/mL, 500 ng/mL, 125 ng/mL, 31,25 ng/mL et 7,8125 ng/mL) a été mélangée à du lysat cellulaire d'expression de la protéine S et incubée. La longueur totale de la protéine S (sous-unités S1 et S2) et la sous-unité S2 ont été détectées comme bandes supérieure et inférieure, respectivement. Le ratio de S total a été indiqué comme la quantité relative de protéine S (protéine S + protéine S2). (B) Effets dégradants de la nattokinase en fonction du temps. Le lysat cellulaire d'expression de la protéine S a été incubé avec 1 µg/mL de nattokinase pendant 0, 10, 30, 60, 120 et 180 min. (C) Effets du traitement thermique ou des inhibiteurs de protéase. Couloir 1 : lysat HEK293 ; couloir 2 : Lysat HEK293 (protéine S) ; voie 3 : HEK293 (protéine S) + nattokinase (5 µg/mL) ; voie 4 : HEK293 (protéine S) + nattokinase (5 µg/mL) + inhibiteur de protéase I ; voie 5 : HEK293 (protéine S) + nattokinase (5 µg/mL) + inhibiteur de protéase III ; voie 6 : HEK293 (protéine S) + nattokinase traitée thermiquement (5 µg/mL). (D) Effet dégradant sur le RBD de la protéine S et de l'ACE2. Les plasmides codant pour la protéine RBD of S et l'ACE2 ont été transfectés dans des cellules HEK293, respectivement. Les lysats cellulaires ont été incubés avec de la nattokinase (7,5 µg/mL) et de la nattokinase traitée par la chaleur (7,5 µg/mL) et un Western blotting a été réalisé.

Pour confirmer si l'effet dégradant de la nattokinase est dû à l'activité enzymatique, la nattokinase a été traitée par chauffage ou par un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Lorsque la nattokinase a été chauffée à 100 °C pendant 5 minutes, l'effet dégradant de la nattokinase a disparu (figure 1C, voie 6). En outre, la perte des bandes de protéine S par la nattokinase a été bloquée lorsque des inhibiteurs de protéase ont été ajoutés (Figure 1C, voies 4 et 5). Par rapport au cocktail d'inhibiteurs de protéines I, le cocktail de protéines III, composé d'AEBSF HCl (chlorhydrate de fluorure de 4-(2-

Aminoéthyl) benzènesulfonyle), d'aprotinine, qui est un inhibiteur irréversible de la sérine-protéase, et de leupeptine, qui est une cystéine-protéase, a clairement bloqué l'activité de la nattokinase. La nattokinase possède les mêmes acides aminés conservés, Ser-His-Asp (Asp32, His64 et Ser221), qui sont des membres de la famille des subtilisines des protéases à sérine [6,18]. La structure cristalline de la nattokinase est presque identique à celle de la subtilisine E de *B. subtilis* DB104 [19]. Ce résultat est conforme à celui d'un rapport précédent selon lequel la nattokinase est une sérine protéase. Nous avons également évalué les effets dégradants de la nattokinase en utilisant des lysats cellulaires exprimant le RBD et l'ACE2. Lorsque 7,5 µg/mL de nattokinase et de lysat cellulaire ont été incubés, les bandes de RBD et d'ACE2 ont disparu (Figure 1D).

2.2. Effets dégradants de la nattokinase sur la protéine S du SRAS-CoV-2 à la surface des cellules transfectées

Ensuite, nous avons examiné si la nattokinase dégrade la protéine S à la surface des cellules transfectées. La protéine S a été transfectée dans les cellules HEK293. Les cellules transfectées ont été incubées avec de la nattokinase pendant 9 h. La protéine S à la surface des cellules a été détectée en utilisant un anticorps anti-protéine S sans perméabilisation des cellules (Figure 2A). La protéine S a été détectée dans les cellules transfectées. Lorsque les cellules transfectées ont été traitées à la nattokinase, la protéine S à la surface des cellules a diminué. Lorsque les cellules ont été traitées avec 25 µg/mL et 2,5 µg/mL de nattokinase, le rapport entre la zone positive pour la protéine S et la zone positive pour le noyau a diminué d'environ 0,3 et 0,7, respectivement (Figure 2B). L'effet dégradant de la nattokinase a été observé en l'absence de cytotoxicité (figure 2C). L'analyse par Western blotting a montré que la quantité de protéine S totale n'a pas changé entre les traitements à la nattokinase et les traitements de contrôle (Figure supplémentaire ; Figure S1). Ces résultats indiquent que la nattokinase dégraderait la protéine S du SARS-CoV-2 dans une gamme de concentrations non toxiques.

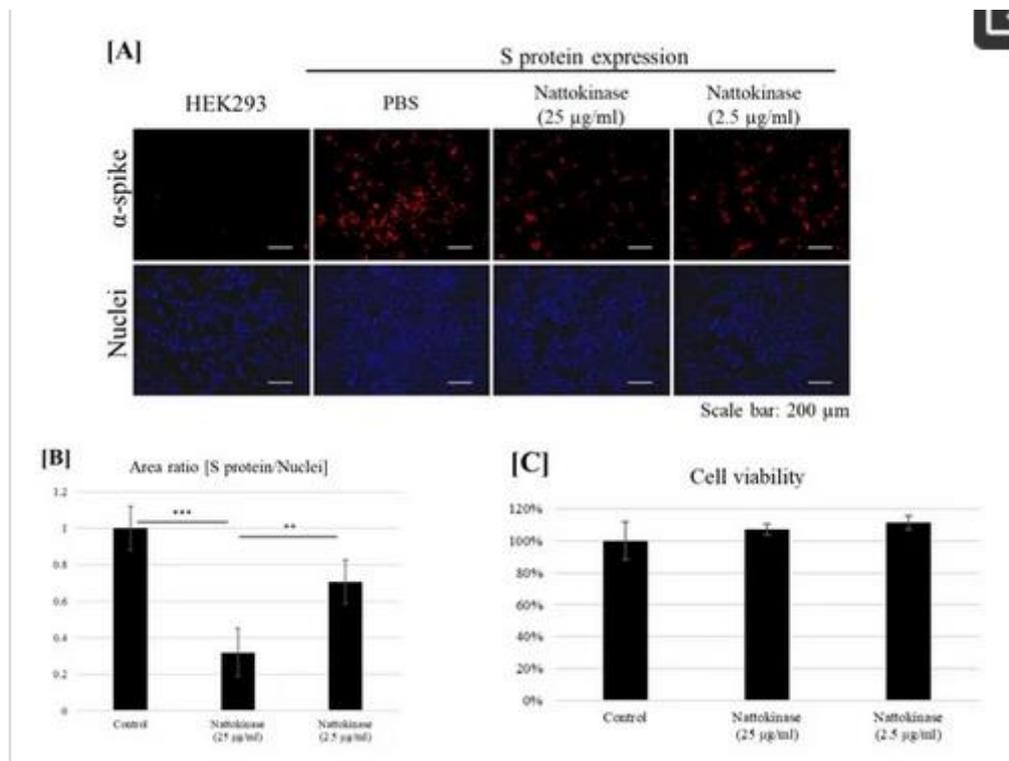


Figure 2 : (A) Effet dégradant de la nattokinase sur la protéine S à la surface des cellules. Spike-pcDNA3.1 a été transfecté avec des cellules HEK293 et incubé pendant 9 h. Après incubation, la nattokinase (25 et 2,5 µg/mL) a été ajoutée au milieu de culture et incubée pendant 13 h. Les cellules ont été fixées et une analyse immunofluorescente a été réalisée. La protéine S à la surface des cellules a été colorée avec l'anticorps anti-protéine spike (rouge) et le noyau a été coloré avec le DAPI (bleu). (B) Rapport entre la surface de la protéine S et la surface positive du noyau. Trois images par échantillon ont été capturées et les zones positives de protéine S/nucléus ont été calculées. Les données sont présentées sous forme de moyenne + écart-type, et la valeur p a été déterminée par une analyse de variance à sens unique (ANOVA) avec le test post-hoc de Tukey à l'aide du logiciel R (R-3.3.3 pour Windows) (** p < 0,01 ; *** p < 0,001). (C) La viabilité cellulaire a été évaluée par le test MTT. La nattokinase indiquée a été ajoutée au milieu de culture et incubée pendant 13 h ; le test MTT a été effectué.

Dans cette étude, nous avons montré que l'activité protéase de la nattokinase contribue à la dégradation de la protéine S. La nattokinase a un effet dégradant non seulement sur les protéines S mais aussi sur l'ACE2 dans les cellules hôtes. La spécificité protéasique de la nattokinase serait faible, car la GAPDH, une protéine d'entretien, a également été dégradée simultanément lors de l'évaluation in vitro de la nattokinase mélangée au lysat cellulaire (figure supplémentaire ; figure S2). En revanche, lorsqu'elle est ajoutée aux cellules, elle ne montre aucun effet sur la viabilité cellulaire et devrait agir comme un agent protecteur à la surface des cellules. Une analyse plus approfondie des produits de dégradation de la nattokinase par spectrométrie de masse est nécessaire pour comprendre les effets de la protéolyse.

La nattokinase possède une puissante activité de dégradation de la protéine S du SRAS-CoV-2 et il a également été démontré qu'elle exerce des effets anti-athérosclérotiques, hypolipidémiant, antihypertenseurs, antithrombotiques, fibrinolytiques, neuroprotecteurs, antiplaquettaires et anticoagulants [20]. Les patients souffrant d'hypertension et de comorbidités cardiovasculaires peuvent facilement tomber très malades à cause du COVID-19 [21]. En raison de l'émergence de nombreuses variantes du SRAS-CoV-2, y compris des souches dont les épitopes cibles du vaccin ont muté, la vaccination seule peut ne pas protéger complètement contre l'infection par le SRAS-CoV-2. La nattokinase et les extraits de natto ont le potentiel pour être développés comme une nouvelle génération de médicaments pour la prévention et le traitement du COVID-19.

3. Matériaux et méthodes

3.1. Matériaux

La nattokinase a été obtenue auprès de Contek Life Science Co, Ltd. (Taipei City, Taiwan). L'activité de la nattokinase était de 60 000 FU/g (FU, unité de fibrinolyse). Les jeux de cocktails d'inhibiteurs de protéase I et III ont été achetés auprès de FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japon). Le plasmide d'expression (pcDNA3.1-SARS2-Spike C9 avec étiquette à l'extrémité C-terminale, pcDNA3.1-hACE2, et pcDNA3-SARS-CoV-2-S-RBD-sfGFP) a été acheté chez Addgene (Watertown, MA, USA). Les cellules HEK293 (JCRB9068) ont été obtenues auprès de la banque cellulaire JCRB (Osaka, Japon).

3.2. Culture cellulaire et Western Blotting

Les cellules HEK293 ont été cultivées à une densité de $3,5 \times 10^5$ cellules/mL dans du DMEM complété par 10 % de FBS, de la L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine pendant une nuit. Les cellules ont été transfectées avec chaque plasmide (pcDNA3.1-SARS2-Spike, pcDNA3-SARS-CoV-2-S-RBD-sfGFP, ou pcDNA3.1-hACE2) et incubées pendant 22 h. Après l'incubation, les cellules cultivées ont été grattées et lavées avec de la solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco (D-PBS) glacée. Un comptage cellulaire a été effectué et le tampon xTractor (Takara Bio

Inc., Shiga, Japon) a été ajouté au précipité cellulaire. Les lysats cellulaires ont été centrifugés à 1300×g pendant 10 minutes à 4 °C et le surnageant a été transféré dans de nouveaux tubes et stocké à -80 °C jusqu'à son utilisation. La concentration en protéines a été déterminée par dosage des protéines à l'acide bicinchoninique (BCA) à l'aide d'un kit de dosage BCA (Takara). Dix microlitres de nattokinase et 10 µL de lysat cellulaire (1 µg/mL) ont été incubés à 37 °C pendant 1 h. Lorsque les effets des inhibiteurs de protéase ont été utilisés, les jeux de cocktails d'inhibiteurs de protéase I et III ont été dilués 10 fois avec du D-PBS, et une solution de cocktail d'inhibiteurs de protéase de 10 µL a été ajoutée au mélange de nattokinase et de lysat cellulaire. Des volumes égaux du mélange réactionnel ont été chargés et le Western blotting a été réalisé. Les anticorps primaires comprenaient un anticorps monoclonal de souris anti-rhodopsine (C9) (1D4) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), un anticorps monoclonal de souris anti-GAPDH (FUJIFILM Wako), un anticorps monoclonal de souris anti-étiquette GFP (Proteintech, Rosemont, IL, USA) et un anticorps anti-ACE2 (Proteintech). Les anticorps secondaires comprennent un anticorps de chèvre anti-souris conjugué à la HRP (Proteintech).

3.3. Essai d'immunofluorescence

Les cellules HEK293 ont été cultivées à une densité de $3,5 \times 10^5$ cellules/mL dans une chambre à 8 puits dans du DMEM complété par 10 % de FBS, de la L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Les cellules ont été transfectées avec pcDNA3.1-SARS2-Spike et incubées pendant 9 h. Après incubation, les cellules ont été traitées avec les échantillons, incubées pendant 13 h, puis fixées dans du paraformaldéhyde à 4 % pendant 30 min. Après une incubation avec l'anticorps monoclonal SARS-CoV/SARS-CoV-2 spike (1A9) (GeneTex, CA, USA) pendant 1 h, il a été incubé avec un anticorps de chèvre anti-souris conjugué à Cy3 pendant 1 h. Les lames ont été colorées avec du DAPI Fluoromount-G et observées à l'aide d'un microscope à fluorescence (BZ-X710, Keyence, Osaka, Japon). Les zones positives pour la protéine S et les zones positives pour le noyau ont été calculées à l'aide du logiciel d'analyse joint BZ-X710 (BZ-X Analyzer). La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide du test au bromure de 3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT). Les cellules ont été cultivées dans des plaques de culture à 24 puits. Après une incubation à 37 °C pendant 24 h, des échantillons ont été ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 13 h supplémentaires. Les cellules ont été mises en suspension dans 500 µL de DMEM contenant 500 µg/mL de MTT. Après une incubation de 3 h à 37 °C, 500 µL d'isopropanol contenant 4 mM HCl ont été ajoutés pour dissoudre le formazan MTT. L'absorbance a été mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

4. Conclusions

Dans cette étude, nous avons démontré que la nattokinase, une sérine protéase, dégrade la protéine S du SRAS-CoV-2. Afin de déterminer si la nattokinase contenue dans l'extrait de natto pouvait inhiber l'infection par le SARS-CoV-2, nous avons analysé la dégradation de la protéine S en mélangeant le lysat cellulaire d'expression de la protéine S et la nattokinase de manière dose-dépendante et en fonction du temps. Le RBD de la protéine S se lie à la partie distale de la membrane de la protéine ACE2. Il a été signalé que l'extrait de natto inhibe l'infection par le SRAS-CoV-2 dans les cellules Vero E6 via la dégradation de la RBD [16]. Nous avons démontré que la dégradation de la protéine S par la nattokinase était bloquée par des traitements thermiques ou par des inhibiteurs de protéines. Nos données suggèrent que l'activité protéase de la nattokinase joue un rôle crucial dans la dégradation de la protéine S. Ensemble, ces résultats soutiennent l'idée que l'inhibition de l'infection par le SRAS-CoV-2 par l'extrait de natto est due à la dégradation de la protéine S par la nattokinase. Ainsi, nos données indiquent que la nattokinase et les extraits de natto ont des effets potentiels sur l'inhibition de l'entrée dans les cellules hôtes du SRAS-CoV-2 par la dégradation de la protéine S.

Matériaux supplémentaires

Les informations complémentaires suivantes peuvent être téléchargées à l'adresse suivante : <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27175405/s1>, Figure S1 : L'effet de l'ajout de nattokinase au milieu de culture des cellules exprimant la protéine S a été évalué par Western blotting ; Figure S2 : Effets dégradants de la GAPDH in vitro.

Contributions des auteurs

Conceptualisation et supervision, T.T., J.Y., K.H., S.C., A.I., T.Y., R.S., Y.I. et M.K. ; méthodologie, tous les auteurs ; analyses Western blot et immunofluorescence, T.T., Y.K. et M.K. ; rédaction-élaboration du projet original, T.T. et M.K. ; rédaction-révision et édition, tous les auteurs. Tous les auteurs ont lu et approuvé la version publiée du manuscrit.

Financement

Cette recherche n'a reçu aucun financement externe.

Déclaration de l'Institutional Review Board

Non applicable.

Déclaration de consentement éclairé

Sans objet.

Déclaration de disponibilité des données

Les données utilisées pour étayer ces résultats ont été incluses dans cet article. Des informations supplémentaires sont disponibles sur demande auprès des auteurs correspondants.

Conflits d'intérêts

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt.

References

1. Alsobaie, S. Understanding the Molecular Biology of SARS-CoV-2 and the COVID-19 Pandemic: A Review. *Infect. Drug Resist.* **2021**, *14*, 2259–2268. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Bayati, A.; Kumar, R.; Francis, V.; McPherson, P.S. SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* **2021**, *296*, 100306. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Bestle, D.; Heindl, M.R.; Limburg, H.; Van Lam van, T.; Pilgram, O.; Moulton, H.; Stein, D.A.; Harges, K.; Eickmann, M.; Dolnik, O.; et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Sci. Alliance* **2020**, *3*, e202000786. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sumi, H.; Hamada, H.; Tsushima, H.; Mihara, H.; Muraki, H. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* **1987**, *43*, 1110–1111. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Dabbagh, F.; Negahdaripour, M.; Berenjian, A.; Behfar, A.; Mohammadi, F.; Zamani, M.; Irajie, C.; Ghasemi, Y. Nattokinase: Production and application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 9199–9206. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Nakamura, T.; Yamagata, Y.; Ichishima, E. Nucleotide sequence of the Subtilisin NAT gene, aprN, of *Bacillus subtilis* (natto). *Biosci. Biotech. Bioch.* **1992**, *56*, 1869–1871. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Urano, T.; Ihara, H.; Umemura, K.; Suzuki, Y.; Oike, M.; Akita, S.; Tsukamoto, Y.; Suzuki, I.; Takada, A. The profibrinolytic enzyme subtilisin NAT purified from *Bacillus subtilis* Cleaves and inactivates plasminogen activator inhibitor type 1. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 24690–24696. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

8. Suzuki, Y.; Kondo, K.; Matsumoto, Y.; Zhao, B.Q.; Otsuguro, K.; Maeda, T.; Tsukamoto, Y.; Urano, T.; Umemura, K. Dietary supplementation of fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery. *Life Sci.* **2003**, *73*, 1289–1298. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
9. Hsia, C.H.; Shen, M.C.; Lin, J.S.; Wen, Y.K.; Hwang, K.L.; Cham, T.M.; Yang, N.C. Nattokinase decreases plasma levels of fibrinogen, factor VII, and factor VIII in human subjects. *Nutr. Res.* **2009**, *29*, 190–196. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
10. Weng, Y.; Yao, J.; Sparks, S.; Wang, K.Y. Nattokinase: An Oral Antithrombotic Agent for the Prevention of Cardiovascular Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 523. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
11. Kim, J.Y.; Gum, S.N.; Paik, J.K.; Lim, H.H.; Kim, K.C.; Ogasawara, K.; Inoue, K.; Park, S.; Jang, Y.; Lee, J.H. Effects of nattokinase on blood pressure: A randomized, controlled trial. *Hypertens. Res.* **2008**, *31*, 1583–1588. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
12. Wu, C.; Gao, C.; Lü, S.; Xu, X.; Wen, N.; Zhang, S.; Liu, M. Construction of polylysine dendrimer nanocomposites carrying nattokinase and their application in thrombolysis. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2018**, *106*, 440–449. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
13. Lampe, B.J.; English, J.C. Toxicological assessment of nattokinase derived from *Bacillus subtilis* var natto. *Food Chem. Toxicol.* **2016**, *88*, 87–99. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
14. Kou, Y.; Feng, R.; Chen, J.; Duan, L.; Wang, S.; Hu, Y.; Zhang, N.; Wang, T.; Deng, Y.; Song, Y. Development of a nattokinase-polysialic acid complex for advanced tumor treatment. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *145*, 105241. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
15. Yan, Y.; Wang, Y.; Qian, J.; Wu, S.; Ji, Y.; Liu, Y.; Zeng, J.; Gong, A. Nattokinase Crude Extract Inhibits Hepatocellular Carcinoma Growth in Mice. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *29*, 1281–1287. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
16. Oba, M.; Rongduo, W.; Saito, A.; Okabayashi, T.; Yokota, T.; Yasuoka, J.; Sato, Y.; Nishifuji, K.; Wake, H.; Nibu, Y.; et al. Natto extract, a Japanese fermented soybean food, directly inhibits viral infections including SARS-CoV-2 in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, *570*, 21–25. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
17. Smaoui, M.R.; Yahyaoui, H. Unraveling the stability landscape of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 9166. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
18. Carter, P.; Wells, J.A. Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature* **1988**, *332*, 564–568. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
19. Yanagisawa, Y.; Chatake, T.; Naito, S.; Ohsugi, T.; Yatagai, C.; Sumi, H.; Kawaguchi, A.; Chiba-Kamosida, K.; Ogawa, M.; Adachi, T.; et al. X-ray structure determination and deuteration of nattokinase. *J. Synchrotron Radiat.* **2013**, *20 Pt 6*, 875–879. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
20. Chen, H.; McGowan, E.M.; Ren, N.; Lal, S.; Nassif, N.; Shad-Kaneez, F.; Qu, X.; Lin, Y. Nattokinase: A Promising Alternative in Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases. *Biomark. Insights* **2018**, *13*, 1177271918785130. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
21. Cancarevic, I.; Malik, B.H. SARS-CoV-2 (COVID 19) Infection in Hypertensive Patients and in Patients with Cardiac Disease. *Cureus* **2020**, *12*, e8557. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

<https://www.mdpi.com/1420-3049/27/17/5405>